

Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenomen für Milchleistungsmerkmale bei den Rinderrassen Fleckvieh und Braunvieh



Franz Seefried

In den 1950er Jahren wurde die künstliche Besamung (KB) zur Bekämpfung von Deckseuchen eingeführt. Die üblichen Deckstiere der Gemeinde wurden ersetzt durch den Tierarzt bzw. den Besamungstechniker, der den Samen von wenigen vermeintlich leistungsfähigen Bullen verteilte. Die Einsatzgebiete erweiterten sich und die Stiere wurden einer immer strengeren Selektion unterworfen. Diese Reduktion der Anzahl eingesetzter Bullen ermöglichte zusammen mit einer routinemäßigen Lesungsprüfung und dem Methodenspektrum der quantitativen Genetik eine effiziente Schätzung der genetischen Anlagen der eingesetzten Bullen. Dazu werden Jungbullen auf der Basis der Ahneninformation als so genannte Testbullen ausgewählt. Die Nachkommen dieser Testbullen werden einer Leistungsprüfung unterstellt. An Hand dieser Information werden für die Bullen Zuchtwerte in den Merkmalen Milch-, Fett- und Eiweißmenge, sowie Fett- und Eiweißgehalt geschätzt. Um die differenzierte ökonomische Bedeutung der einzelnen Milchleistungsmerkmale in der Zucht zu berücksichtigen, wurde der Milchwert (MW) als zentrales Selektionskriterium geschaffen. Dieser wird über eine Berechnungsformel bestimmt, die monetäre Gewichtungsfaktoren für die einzelnen Milchleistungsmerkmale enthält. In den letzten zehn Jahren konnten dank ausgedehnter Datenerfassung auch Zuchtwertschätzungen für Merkmale der Fleischleistung und der Fitness entwickelt werden. Eine kombinierte Selektion nach Leistungs- und Funktionalitätskriterien trägt wesentlich zu einer verbesserten Ökonomik im Bereich der Milcherzeugung bei. Die Selektionsgenauigkeit und das Generationsintervall (durchschnittliches Alter der Eltern bei Geburt der Nachkommen) sind zwei Einflussfaktoren, die den maximal möglichen Zuchtfortschritt bestimmen. Jede Selektion auf der Basis von Nachkommenseleistungen bewirkt ein relativ langes Generationsintervall, was eine Limitierung des Zuchtfortschrittes pro Zeiteinheit zur Folge hat. Seit einigen Jahren wird nun versucht, den Merkmalskomplex Milchleistung molekulargenetisch zu analysie-

ren, um neben einer Untersuchung der genetischen Ursachen der Milchsynthese den Selektionserfolg bzw. den Zuchtfortschritt zu optimieren. Das vorliegende Projekt beschäftigt sich mit der genomischen Charakterisierung von Kandidatengenomen für Milchleistungsmerkmale, und mit der Identifizierung von DNA-Markern für eine markergestützte Selektion (engl. Marker Assisted Selection, MAS). Dafür werden erstmals die beiden Rinderrassen Braunvieh und Fleckvieh untersucht. Nach der Rasse Holstein-Friesian sind dies die beiden häufigsten Rassen in der deutschen Milchviehhaltung. Neben Leistungsmerkmalen sind bei beiden Rassen auch Merkmale der Fitness im Zuchtziel berücksichtigt. Fleckvieh ist eine Zweinutzungsrasse, bei der Merkmale der Milch- und Fleischleistung gleichermaßen von Bedeutung sind. Braunvieh ist eine Milch betonte Zweinutzungsrasse mit im Vergleich zum Fleckvieh geringerer Bedeutung der Fleischleistung. Dagegen hat beim Braunvieh das Merkmal Milcheiweißgehalt in der Selektion ein besonderes Gewicht.

Angewandte Molekulargenetik in der Rinderzucht

Merkmale der Milchleistung sind quantitativer Natur und werden theoretisch von unendlich vielen Genen beeinflusst. Daraus ergibt sich für die Milchleistung ein komplexer molekulargenetischer Hintergrund. Dennoch konnten in den letzten Jahren mit Hilfe von DNA-Markern Regionen des Rindengenoms, so genannte "Quantitative Trait Loci" (QTL) identifiziert werden, in denen Gene vermutet werden, die einen überdurchschnittlich großen Beitrag zum Merkmal der Milchleistung beitragen. Beispielsweise beschäftigte sich das ADR-Forschungsprojekt "Genomanalyse Rind" in der ersten Phase mit der QTL-Kartierung. Dabei konnten unter Verwendung eines genomweiten Mikrosatellitenmarkersets bei der Rasse Holstein-Friesian Regionen auf Chromosom 6 nachgewiesen werden, die den Milchprotein-gehalt beeinflussen (Kühn *et al.*, 1996) (<http://www.animalgenome.org>). Grundlegende Vor-

aussetzung für eine erfolgreiche QTL-Kartierung ist die Verfügbarkeit von ausreichend vielen und ausreichend großen (70 Söhne pro Bullenvater) väterlichen Halbgeschwistergruppen (Weller *et al.*, 2004). Dies ist der Hauptgrund, warum bisherige QTL-Studien häufig auf die Rasse Holstein-Friesian beschränkt waren. Nach einer erfolgreichen QTL-Grobkartierung wird im Folgenden versucht, mit einem engeren Markernetz die Position des QTLs exakter zu bestimmen. Diese Information könnte bereits in einer MAS verwendet werden. Dennoch bleibt die Identifikation der für den QTL verantwortliche(n) Mutation(en) bzw. der verantwortlichen Gene das Ziel von molekulargenetischen Untersuchungen. Neue Perspektiven für die Analyse der genetischen Zusammenhänge der Milchleistung ergab die Veröffentlichung der bovinen Genomsequenz im Oktober 2004. Bei bekannter humaner Genstruktur können über einen Sequenzabgleich (engl. Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) der humanen und bovinen Genomsequenz funktionelle Kandidatengene in den QTL-Regionen identifiziert werden, da neben den kodierenden Sequenzabschnitten der Gene, auch die Anordnung der Gene in einem bestimmten Chromosomenabschnitt zwischen den Säugerspezies stark konserviert ist (Andersson *et al.*, 2001). Das Ergebnis von BLAST, ein so genanntes Alignment, ist eine Gegenüberstellung von Abschnitten der gesuchten Sequenz mit ähnlichen Abschnitten aus der Vergleichssequenz. Nach Ableitung der bovinen Genstruktur wird über vergleichendes (Re-)Sequenzieren von mehreren Tieren nach DNA-Polymorphismen, v. a. Einzelbasenaustausche (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) im Rindengenom gesucht. Für die Durchführung einer Assoziationsstudie werden mehrere hundert Bullen mit sicher geschätzten Zuchtwerten an diesen SNPs typisiert. Zwei SNPs können in ihrer allelischen Konfiguration in der Population voneinander abhängig und damit in Kopplungsungleichgewicht (engl. Linkage Disequilibrium, LD) sein. Daher ist vor der Typisierung im großen Tiermaterial eine Auswahl möglichst unabhängiger SNPs sinnvoll.

Bei quantitativ genetischen Merkmalen folgen die Phänotypen (Zuchtwerte) in ihrer Merkmalsausprägung einer Normalverteilung. Im Rahmen einer Assoziationsstudie wird nun nach einem Zusammenhang zwischen der Allelfrequenz der untersuchten SNPs und den Zuchtwerten unter Durchführung einer Regressionsanalyse gesucht (vgl. Abb. 1).

Beschreibung der vorliegenden Assoziationsstudie

Zu Beginn wurde eine automatisierte und bioinformatische Kandidatengensuche auf dem bovinen Chromosom 6 mit der Software „GenScore“ durchgeführt. „GenScore“ wurde im Rahmen des BMBF geförderten Projektes „Bioinformatics for Functional Traits of Mammalian Genomes“ (BFAM) von O. Bininda-Emonds am Lehrstuhl für Tierzucht der TU-München-Weihenstephan entwickelt. Sechs funktionell, sowie positionell interessante Kandidatengene wurden ausgewählt und deren bovine Genstruktur mit Hilfe von BLAST abgeleitet. Dazu wurde die bovine Genomsequenz vom ftp-Server des bovinen Genome Project des Human Genome Sequencing Centers am Baylor College of Medicine (www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine) auf den lokalen Server heruntergeladen und anschließend für die lokale BLAST-Suche verwendet. Anschließend wurden Abschnitte dieser Gene resequenziert. Dabei wurden 206 SNPs identifiziert, wovon 65 SNPs für die Assoziationsstudie ausgewählt wurden. 964 Bullen der Rasse Fleckvieh, bzw. 742 Bullen der Rasse Braunvieh wurden an diesen SNPs und unter Verwendung des iPLEX Assays und der MALDI-TOF Typisierungsmethodik (www.sequenom.com) typisiert. Im Rahmen von Assoziationsstudien wird nun am Lehrstuhl für Tierzucht der TU-München-Weihenstephan nach statistisch signifikanten Zusammenhängen zwischen den Typisierungsergebnissen und den Zuchtwerten der Bullen gesucht.

Interpretation und Verwendbarkeit der Ergebnisse im Fall einer signifikanten Assoziation

Identifizierte SNPs mit signifikanten Assoziationen können direkt kausale Mutationen darstellen, die einen Teil der Variation des beobachteten Merkmals erklären. Üblicherweise sind dies SNPs im kodierenden bzw. im regulatorischen Bereich eines Gens. SNPs mit signifikanten Assoziationen im nicht kodierenden und nicht regulatorischen Bereich eines Gens können mit der tatsächlich kausalen Mutation

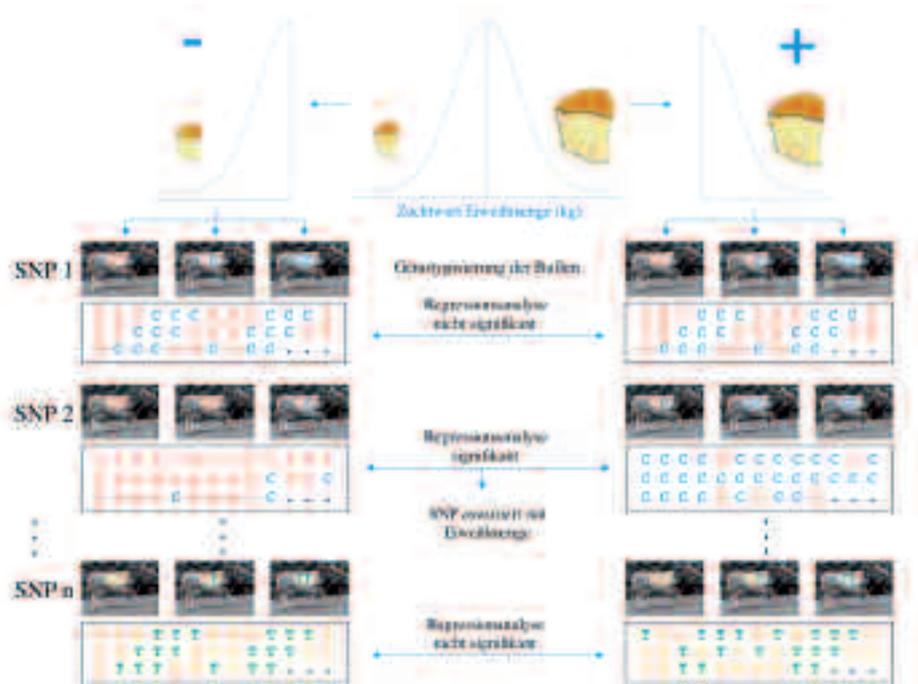


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Assoziationsstudie für das Merkmal ‚Eiweißmenge‘. Nach der Genotypisierung von Bullen werden im Rahmen einer Regressionsanalyse signifikante Zusammenhänge zwischen den Allelfrequenzen der SNPs und den phänotypischen Merkmalswerten (Zuchtwerte) der Bullen gesucht.

im selben oder einem der benachbarten Gene in LD liegen und sind vor dem Hintergrund einer Verwendbarkeit der Ergebnisse ähnlich informativ. Je nach dem zu welchen Merkmalen der Milchleistung signifikante Assoziationen gefunden wurden, tragen die Ergebnisse der Assoziationsstudien dazu bei, die Milchsynthese molekulargenetisch zu erklären. Biochemisch gesehen ist das Merkmal Milchmenge eine Funktion der Laktosesyntheseleistung. Durch deren Synthese in den Milch bildenden Zellen kommt es zum Aufbau eines osmotischen Drucks, der eine Wassereinlagerung in den Alveolen der Milchdrüse bewirkt. Je größer die synthetisierte Laktosemenge, desto höher die Wasserdiffusion aus dem Blut in die Alveolen. Bei konstanter Menge an synthetisiertem Milchfett bzw. Milchprotein führt eine höhere Laktosesynthese zu einer Senkung der Gehalte an Milchfett, bzw. Milcheiweiß. Daraus erklärt sich die negative genetische Korrelation zwischen dem Merkmal Milchmenge und den Merkmalen Milchfett- bzw. Milcheiweißgehalt. Die vorhandene, negative genetische Korrelation lässt im Fall von signifikanten Assoziationen auf die Gehaltsmerkmale sowie auf die Milchmenge antagonistische Effekte erwarten. Nach der Schätzung des Allelsubstitutionseffektes können die signifikanten SNPs als Marker im Rahmen einer markergestützten Zucht-

wertschätzung verwendet werden. Dadurch könnten für markertypisierte Bullen im Vergleich zu nicht typisierten Bullen bei gleicher Anzahl an phänotypischer Information genauere Zuchtwerte geschätzt werden. Daneben würde die Typisierung von Tieren ohne phänotypische Information (z.B. Jungbullen) eine genauere Bestimmung der Ahnenzuchtwerte ermöglichen. Aus einer Gruppe von Bullenkälbern mit identischem Ahnenindex, könnte so der vermutlich beste für den Testeinsatz ausgewählt werden.

Signifikante Assoziationen aus dem vorliegenden Projekt würden einen Beitrag zur Aufklärung der molekulargenetischen Zusammenhänge der Milchsynthese leisten. Die Implementierung der Resultate in die Zuchtwertschätzung würde erstmalig eine MAS bei den beiden Rassen Braunvieh und Fleckvieh ermöglichen. Dadurch könnte der maximal mögliche Zuchterfolg erhöht und ein Beitrag zu einer gesteigerten Konkurrenzfähigkeit der beiden Rassen geleistet werden.

Kontakt

Dipl.-Ing.agr. Univ. Franz Seefried
Lehrstuhl für Tierzucht,
TU München-Weihenstephan
E-Mail: franz.seefried@tierzucht.tum.de